

⑫ 公開特許公報 (A) 平3-128321

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④③公開 平成3年(1991)5月31日

A 61 K 31/40
// A 61 K 9/107
C 07 D 487/22

ABZ

K

7475-4C

7624-4C

7019-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑤④発明の名称 人工酸素運搬体

②特 願 平1-148887

②出 願 平 1 (1989) 6 月 12 日

⑦2 発 明 者 土 田 英 俊 東京都練馬区関町南2-10-10

⑦發明者 西出 宏之 東京都中野区鷺宮2-16-6

⑦出 願 人 財団法人生産開発科学 京都府京都市左京区下鴨森本町15番地
研究所

⑦出願人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号

⑦④代理人 弁理士 安藤 順一

明細書

1. 発明の名称

人工酸素運搬体

2. 特許請求の範囲

- (1) 鉄ボルフィリン錯体、脂肪酸トリグリセリドからなることを特徴とする人工酸素運搬体。
- (2) 鉄ボルフィリン錯体がメソーテトラ (α , α , α - α - α - α -ピバラミドフェニル) ボルフィナト鉄 (II) である請求項 1 記載の人工酸素運搬体。
- (3) 鉄ボルフィリン錯体がイミダゾール誘導体を配位したものである請求項 1 又は 2 記載の人工酸素運搬体
- (4) 脂肪酸トリグリセリドがアルキル基炭素数 6 ~ 10 の脂肪酸トリグリセリドである請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の人工酸素運搬体。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、人工血液や臓器保存液、人工肺などの酸素供給液として使用される酸素運搬体に関し、

さらに詳しくは、酸素を迅速かつ可逆的に吸脱着できる特性を有する新規な人工酸素運搬体に関する。

〔従来の技術〕

人工血液等として使用される酸素運搬体としては、(1)フルオロカーボン乳剤、(2)ヘモグロビン修飾物、(3)鉄ポルフィリン錯体を利用したもの、が開発研究されている。

(1)は酸素を物理的に溶解するパーフルオロカーボンを界面活性剤を用いて生理食塩水に分散した液であるが酸素運搬量は高くない。また、パーフルオロカーボンの生体毒性が完全には解消されてはいないため、現在人工血液としては利用されていない。(2)はヒトヘモグロビンを化学修飾し、またはマイクロカプセル化することによって、半人工の酸素運搬体を得ようとするものであるが、ヘモグロビンの変質などにもとまらない、酸素運搬量は低くとどまり、また原料とするヒトヘモグロビンの精製技術も確立していない。(3)は本発明者らが提案したものであり、全合成の鉄ポルフィリン錯

体が一定条件で酸素を迅速かつ可逆的に吸脱着できる性質を利用してリン脂質リポソームに鉄ポルフィリン錯体を包埋させ、人工酸素運搬体としたものである（特公昭59-25767号公報参照）。

(3)の人工酸素運搬体は全合成系であり、しかも天然ヘモグロビンの活性中心である鉄ポルフィリン錯体による酸素吸脱着であるため、①酸素吸脱着が迅速、②酸素親和性が人血に匹敵、③色調が血液と同じく赤色、④長期保存可能、⑤大量合成可能等の特徴を有している。

〔発明が解決しようとする課題〕

前記(3)の人工酸素運搬体は次世代の人工血液と目されているが、次の様な点で未だ問題がある。(1)鉄ポルフィリン錯体の溶解濃度が 10mmol/l 程度であり、酸素運搬量が 20ml 酸素/ 100ml 媒体にとどまる。(2)大量のリン脂質を利用するため、その毒性が一部未解決である。(3)両親媒性の鉄ポルフィリン錯体が必要であるが、この様な鉄ポルフィリン錯体の合成は煩雑である。

が解決できないままである。

〔課題を解決するための手段と作用〕

本発明者は従来より酸素を可逆的に吸脱着できる鉄ポルフィリン錯体の調製と、これらの物質の生体内挙動の解明を継続的にこなってきた。

本発明はその結果到達したものであり、鉄ポルフィリン錯体と脂肪酸トリグリセリドとからなる人工酸素運搬体に係るものである。

ここで鉄ポルフィリン錯体としては、ポルフィリン鉄の不可逆劣化を抑える上で、メソーテトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -テトラビバラミドフェニル)ポルフィナト鉄(II)が望ましい。

更にこの鉄ポルフィリン錯体には、酸素親和力向上の為にイミダゾール誘導体を配位させることができる。鉄ポルフィリン錯体に配位させるイミダゾール誘導体としては、鉄ポルフィリン錯体およびイミダゾール誘導体自身の水相への漏れ出しを防ぐため、疎水性のイミダゾール誘導体が望ましい。この疎水性のイミダゾール誘導体としては、1-ラウリルイミダゾール、1-ラウリル-2-

このため、上記①～⑤の利点を保持したまま、より簡略な鉄ポルフィリン錯体系で人工酸素運搬体を組み立てることができれば、その意義は大きい。

しかし、鉄ポルフィリン錯体に酸素の可逆的な吸脱着能を発現させるためには、(1)ポルフィリン化合物の面上に適当な置換基を設け、ポルフィリン鉄の不可逆劣化を抑える、(2)鉄ポルフィリン錯体を疎水的環境に置く、(3)ポルフィリン鉄をイミダゾールなどの含窒素芳香族と配位結合させ、酸素結合の親和力を発揮しうる様にすることが必要である。他方、鉄ポルフィリン錯体を生体内に投与するためには、(1)鉄ポルフィリン錯体の毒性を徐放効果などによって抑える、(2)鉄ポルフィリン錯体を生理食塩水など生理条件を満足した水媒体中に安定に分散させる、(3)分散体の粒径を十分小さくして毛細血管を通過できる様にすると共に、生体内で速やかには貪食、消去されない様に、等が必要である。このように鉄ポルフィリン錯体を人工酸素運搬体に適用するためには多くの問題

メチルイミダゾールなどの長鎖アルキルイミダゾール、及び1-トリチルイミダゾール、1-トリチル-2-メチルイミダゾール等が例示できる。

脂肪酸トリグリセリドは、鉄ポルフィリン錯体を水媒体中で疏水雰囲気保つための担体である。この脂肪酸トリグリセリドとしては、水中での分散安定性の良さや鉄ポルフィリン錯体の溶解能力の良さの点で、アルキル基炭素数6～10の脂肪酸トリグリセリドが望ましい。

本発明の人工酸素運搬体の具体的調製に当たっては、脂肪酸トリグリセリドに鉄ポルフィリン錯体を溶解した後、この鉄ポルフィリン錯体を溶存させた脂肪酸トリグリセリドを、リン脂質、ポリオキシエチレン、ポリプロピレンとポリエチレングリコールとのブロック共重合体等の界面活性剤の存在下に超音波乳化法やD相乳化法で水中に分散させれば良い。

最終の分散液中の脂肪酸トリグリセリドの含量は5～30wt%が適当である。鉄ポルフィリン錯体を構築する鉄イオンとイミダゾール誘導体中に

含まれる芳香族アミン残基（配位子）のモル比は1～10倍の範囲内が適当である。また、界面活性剤の配合量は、例えばリン脂質又はポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールのブロック共重合体である高分子界面活性剤を使用する場合で、脂肪酸トリグリセリドの1/10～1/100倍（重量比）とすれば良い。

メソテトラ（ α , α , α , α - α -ビバミドフェニル）ポルフィナト鉄（II）は、人工酸素運搬体を調製する際に当初添加しておいたメソテトラ（ α , α , α , α - α -ビバミドフェニル）ポルフィナト鉄（III）に、後に亜二チオン酸又はアスコルビン酸などの還元剤を添加することによって還元生成することができる。この亜二チオン酸又はアスコルビン酸などの還元剤は、鉄ポルフィリン錯体を構築する鉄イオンの1～10倍（モル比）の範囲内で例えば窒素雰囲気下で添加すれば良い。

実施例1

アルキル鎖長の炭素数が8である中鎖脂肪酸ト

リグリセリド（トリカプリリン）20gにメソテトラ（ α , α , α , α - α -ビバミドフェニル）ポルフィナト鉄（III）（1mmol）および1-ラウリル-2-メチルイミダゾール（5mmol）を溶解させ、卵黄レシチン（1g）を加えた後、生理食塩水（200ml）を加えながら、窒素下において超音波を照射して乳化する。炭酸水素ナトリウムにてpH 7.4に調整し、アスコルビン酸（10mmol）を加え、ポルフィナト鉄を還元することにより調製した。

得られた赤色乳濁液は、動的光散乱法での粒径分布測定によれば200 ± 50nmの小粒子分散液であり、走査型顕微鏡観察から球状の形態を確認した。これらの粒径は室温で数カ月間保存後も変化はなく、安定であった。ゲルパーミエーションクロマトグラフィ測定においてメソテトラ（ α , α , α , α - α -ビバミドフェニル）ポルフィナト鉄（III）（420nm）および卵黄レシチン（260nm）に基づく溶出曲線の一致により、ヘム誘導体が脂肪酸トリグリセリド小粒子中へ包含されていること

を確認した。さらに、ヘム誘導体の脂肪酸トリグリセリド乳剤中への包含率は、脂質球/ヘム=10～40/1（重量比）ではほぼ100%と高い効率であることを確認した。

以上より、トリグリセリド脂質球は高い濃度のヘム誘導体を水中に安定分散できることが明らかになった。

この、人工酸素運搬体への酸素の可逆的な吸脱着は、例えば可視スペクトルから確認できる。脱酸素化ヘム（ λ_{max} ; 438, 533, 560nm）の人工酸素運搬体に酸素ガスを吹き込むと、ヘム-酸素錯体（ λ_{max} ; 422, 545nm）を形成した。これに窒素ガスを吹き込むとデオキシ型に戻った。このデオキシ-デオキシサイクルは37℃で1000回以上観測できた。

この人工酸素運搬体は、その酸素錯体の赤外吸収スペクトルによれば、酸素伸縮振動（ ν_{O_2} ）が1160 cm^{-1} （半幅幅14 cm^{-1} ）であり、ガス状 O_2 とは異なってスーパーオキシドの ν_{O_2} （1145 cm^{-1} ）に近いことから、bent/end-on型の酸素配位様式で、

Fe（III）- O_2 に電荷分離した電子状態にあることがわかった。この結果は赤血球内のオキシヘモグロビンと同じであり、赤血球と同じ原理に基づいて酸素運搬ができることを示している。

また酸素結合解離平衡曲線測定によれば、肺（110mmHg）-末梢組織（40mmHg）の酸素分圧差間の酸素運搬効率は約25%（37℃）で、人工血液として有効に働くことを示している。

酸素親和性（ $P_{1/2}$ ）26mmHg、酸素結合のエンタルピー変化-14kcal/mol、エントロピー変化-42kcal/deg·molより、人工酸素運搬体の酸素結合の挙動は赤血球中のヘモグロビンのそれらの値（各々27mmHg, -14kcal/mol, -42kcal/deg·mol）とほぼ一致することを確認した。フラッシュホトリシス法、ストップドフロー法により求めた酸素結合速度定数（ k_{on} ）は約 10^4 （ $M^{-1} S^{-1}$ ）で、迅速な酸素結合能力も明らかになった。以上の結果は体内を高速流動したときもそれに追隨して酸素運搬できることを示している。

このようにして調製した人工酸素運搬体液に充

分空気を吹き込み、兎（約3Kg 体重）の血中に50 mlを脱血してから同量投与し、その酸素運搬能を検討した（5羽実施）。脱血後、混合静脈血の赤血球の酸素飽和度は34%に低下したが、本液の投与により53%に回復した（脱血前は62%）。投与後一定時間毎の採血液の血漿層にあるヘムの可視吸収スペクトルから、ヘム残留量を測定したところ、血管内半減期は約6時間であることがわかった。血尿は全く認められなかった。臓器所見では特に異常を認めなかった。

实施例 2

アルキル鎖長の炭素数が10である中鎖脂肪酸トリグリセリド(トリカブリン)20gに、メソテトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -オビバラミドフェニル)ボルフィナト鉄(Ⅲ)(1mmol)、1-ラウリルイミダゾール(2mmol)、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールとのブロック共重合体である高分子界面活性剤(平均分子量3330、ポリプロピレングリコール部の平均分子量2000、製品中に40%のポリエチレングリコール部

実施例 1 のメソーテトラ (α , α , α , α -
ービバラミドフェニル) ポルフィナト鉄 (III) の
仕込量を 4mmol、1-ラウリル-2-メチルイミ
ダゾールの量を 12mmol、アスコルビン酸の添加量
を 50mmol とする他は同実施例と同様にして人工酸
素運搬体を調製した。

血液への酸素溶解量を定量する方法として常用される Van Slyke 法 (J. Biol. Chem. 61 巻, 523-527 頁, 1924 年) にて、本人工酸素運搬体液 100ml 当たりの酸素ガス溶解量を 37℃ で測定したところ 44ml と極めて高い酸素保持量を示した。

实施例 4

実施例 1 のアルキル鎖長の炭素数が 8 である中鎖脂肪酸トリグリセリド（トリカブリン）のかわりにトリカブリン中にトリカブリンを 10、50 又は 75wt% 混合させた脂肪酸トリグリセリドを用い、その他は実施例 1 と同様にして人工酸素運搬体を調製し、その酸素吸脱着能測定を行った。

酸素の迅速、且つ可逆的な吸脱着能は、実施例 1 の場合と同様であり、本実施例で得た人工酸素

を含む) (1.2g)を加え、さらにプロピレングリコール (12ml)を混ぜた後、これを窒素下70℃で攪拌 (10000 rpm × 30分)し、生理食塩水 (200ml)を加えた後、窒素下30℃で再び攪拌 (10000rpm × 15分)した。この液を炭酸水素ナトリウムにてpH7.4に調製した後、亜二チオン酸 (3mmol)を加え、鉄を還元することにより赤色乳濁液を調製した。

動的光散乱法での粒径分布測定によれば脂質粒子の直径は $600 \pm 200 \text{ nm}$ であり、この粒径は室温で数カ月間変化がなかった。

実施例 1 と同様にしてヘム誘導体の脂質小粒子への包含を確認し、更に、ヘム誘導体の脂質球への包含率は、ほぼ 100 % と高い効率であることを確認した。酸素の迅速、且つ可逆的な吸脱着能は、実施例 1 の場合と同様であり、 $P_{1/2} = 36 \text{ mmHg}$, $k_{on} = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ の結果を得た。

以上により本実施例で得た人工酸素運搬体が人工血液として有効に働くことがわかった。

实施例 3

運搬体が人工血液として有効に働くことがわかった。

实施例 5

実施例 1 のポリフィナト鉄としてメソーテトラ
(α , α , α , α - o -20'-ベンジロキシ-2,
2'-ジメチルエーコサンアミドフェニル) ポリ
フィナト鉄(Ⅲ)を用い、その他は実施例 1 と同
様にして人工酸素運搬体を調製し、その酸素吸脱
着能を測定した。その結果は $P_{1/2} = 30 \text{ mmHg}$, $k_{on} =$
 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ で酸素の迅速且つ可逆的な吸脱着能が
認められた。

〔發明の效果〕

本発明の人工酸素運搬体によれば、脂肪酸トリグリセリドをキャリアーとして鉄ポルフィリン錯体を水媒体中に極めて高い濃度（人血を上回る20 mM）まで溶解することが可能である。即ち、媒体100ml 当り50ml 近い酸素ガス（物理的に溶解できる量の約150 倍）を保持できる。

また本発明の一成分である脂肪酸トリグリセリドは、従来、中鎖脂肪酸トリグリセリドと界面活

性剤とからなる乳剤が静注用脂肪乳剤として汎用され、脂溶性薬物の運搬体として広く応用されているところから明らかな様に大量投与しても毒性のない数少ない物質であり、安心して使用可能である。

以上のほか本発明の人工酸素運搬体は、(1) 酸素吸脱着が迅速かつ可逆的であり、酸素親和力も適切である (2) 室温にて数カ月を越えて保存できる (3) 全合成物であるためウイルスなどに汚染されていない (3) 比較的構造の簡単な鉄ポルフィリン錯体と安価な脂肪酸トリグリセリドからなり経済性が良い、等の数々の利点を有するものである。

特許出願人

財団法人 生産開発科学研究所

代理人 弁理士 安藤 順一